



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ :

C12P 7/24, 17/04

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 94/02621

(43) Date de publication internationale:

3 février 1994 (03.02.94)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00745

(22) Date de dépôt international: 21 juillet 1993 (21.07.93)

(30) Données relatives à la priorité:

92/09174

24 juillet 1992 (24.07.92)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): V. MANE FILS S.A. [FR/FR]; 620, route de Grasse, F-06620 Bar-sur-Loup (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MANE, Jean [FR/FR]; Domaine Saint-Mathieu, 290, route de Saint-Mathieu, F-06130 Grasse (FR). ZUCCA, Joseph [FR/FR]; "Les Genêts", Villa F1, 54, boulevard Guillaume-Apollinaire, F-06600 Antibes (FR).

(74) Mandataires: BOULINGUIEZ, Didier etc.; Cabinet Plaseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cédex 09 (FR).

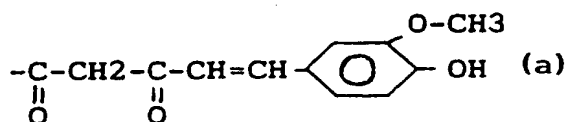
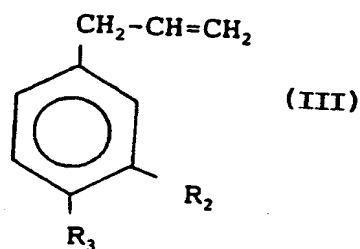
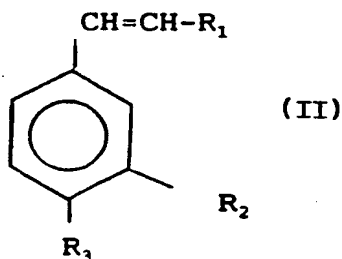
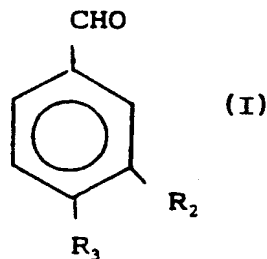
(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: METHOD FOR ENZYMATICALLY PREPARING AROMATIC SUBSTANCES

(54) Titre: PROCÉDE DE PREPARATION DE SUBSTANCES AROMATIQUES PAR VOIE ENZYMATIQUE



(57) Abstract

A method for preparing aromatic substances having formula (I), wherein a substrate of formula (II) or an isomer of these precursors, also termed a substrate, in particular selected from those of formula (III), in which formulae R₁ may be a -CH₃, -CH₂OH, -CHO, -COOH, or (a) radical, R₂ may be a -H, -OH or -O-CH₃ radical, R₃ may be a -H, -OH or -O-CH₃ radical, and R₂ and R₃ may form a methylenedioxy bridge (b), is exposed to the activity of a lipxygenase.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé de préparation de substances aromatiques de formule (I) caractérisé par le fait que l'on soumet un substrat répondant à la formule (II) ou l'un des isomères de ces précurseurs, appelé également substrat, choisi notamment parmi ceux répondant à la formule (III) dans lesquelles R₁ peut être un radical -CH₃, -CH₂OH, -CHO, -COOH, (a), R₂ peut être un radical -H, -OH, -O-CH₃, R₃ peut être un radical -H, -OH, -O-CH₃, R₂ et R₃ peuvent former un pont méthylénedioxy (b) à l'action d'une lipoxygénase.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

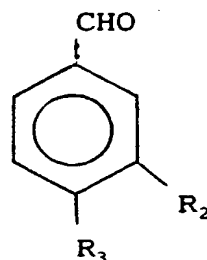
AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TC	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCÉDE DE PREPARATION DE SUBSTANCES AROMATIQUES
PAR VOIE ENZYMATIQUE

L'invention a pour objet un procédé de préparation de certaines substances aromatiques par voie enzymatique.

Par substances aromatiques on entend toutes substances utilisées pour le parfum qu'elles dégagent et/ou le goût qu'elles procurent dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique ou de la parfumerie.

Le procédé conforme à l'invention permet la préparation de substances aromatiques de formule :



dans laquelle

R_2 peut être un radical -H, -OH, -O-CH₃,

R_3 peut être un radical -H, -OH, -O-CH₃,

R_2 et R_3 peuvent former un pont méthylènedioxy $\begin{smallmatrix} -O \\ \diagup \diagdown \\ -O \end{smallmatrix}$

Avantageusement ces substances aromatiques appartiennent au groupe comprenant : la vanilline, le benzaldéhyde, l'aldéhyde anisique, l'aldéhyde para-hydroxybenzoïque, l'héliotropine et l'aldéhyde proto-catéchique.

Jusqu'à présent, il était connu de préparer la vanilline selon différents procédés :

- à partir de guaiacol, par voie chimique, mais la vanilline est obtenue dans un mélange comprenant de nombreuses impuretés, d'où des rendements moyens ;
- à partir de la dégradation de la lignine, mais l'obtention de la vanilline à l'état pur nécessite une grande consommation de produits chimiques et d'énergie et occasionne de

nombreux rejets écotoxiques ;

- à partir de safrole, composé présent dans l'essence de sassafras permettant ainsi l'obtention d'un mélange isovanilline-vanilline qui sont deux isomères difficiles à séparer ;
- à partir d'eugénol, composé présent dans l'huile de clou de girofle, ce composé subissant une première étape d'isomérisation en isoeugénol (cis et trans en proportions variables) puis une deuxième étape d'oxydation pour donner la vanilline ; cependant, ce procédé chimique donne des rendements très moyens.

De plus, tous les procédés de l'art antérieur faisant appel à au moins une manipulation chimique, le produit obtenu ne peut qu'être appelé "vanilline de synthèse ou d'hémisynthèse" et ne peut en aucun cas être appelé "vanilline d'origine naturelle", même si le substrat de départ est naturel (cas de l'eugénol ou du safrole).

En ce qui concerne le benzaldéhyde, il est produit par exemple à partir d'aldéhyde cinnamique traité en milieu alcalin sous pression et à haute température (brevet US 4 617 419).

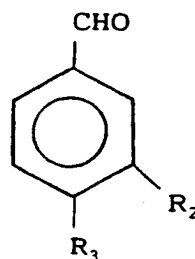
Quant à l'aldéhyde anisique, il est classiquement produit par oxydation chimique de l'anéthole que l'on trouve en grande quantité dans l'essence de badiane.

Mais, tout comme la vanilline et pour les mêmes raisons, ces deux composés ne peuvent pas être qualifiés de "naturels".

L'invention a pour but de remédier aux inconvénients de l'art antérieur et propose un procédé biotechnologique permettant la préparation de certaines substances aromatiques de bonne pureté avec des rendements élevés.

Ainsi, la Société demanderesse a eu le mérite d'établir qu'il était possible de préparer des substances aromatiques de formule :

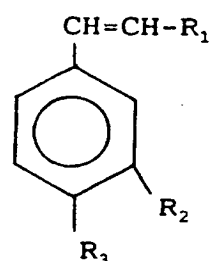
3



5

en soumettant l'un de leurs précurseurs, appelé substrat, répondant à la formule :

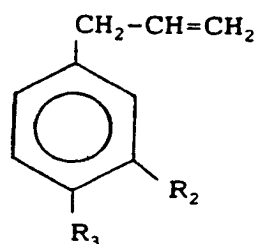
10



15

ou l'un des isomères de ces précurseurs, appelé également substrat, choisi notamment parmi ceux répondant à la formule :

20

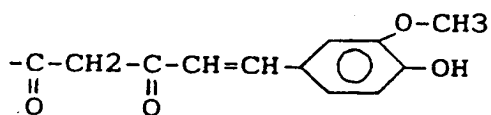


25

dans lesquelles

R_1 peut être un radical $-CH_3$, $-CH_2OH$, $-CHO$, $-COOH$,

30



R_2 peut être un radical $-H$, $-OH$, $-O-CH_3$,

R_3 peut être un radical $-H$, $-OH$, $-O-CH_3$,

35

R_2 et R_3 peuvent former un pont méthylènedioxy $\begin{matrix} -O > \\ -O > \end{matrix}$

à l'action d'une enzyme : la lipoxygénase ou lipoxidase.

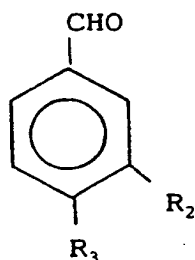
Cette enzyme est répertoriée sous la référence EC 1

13 11 12 dans l'ouvrage "Enzyme Nomenclature" (IU BMB Academic Press 1992).

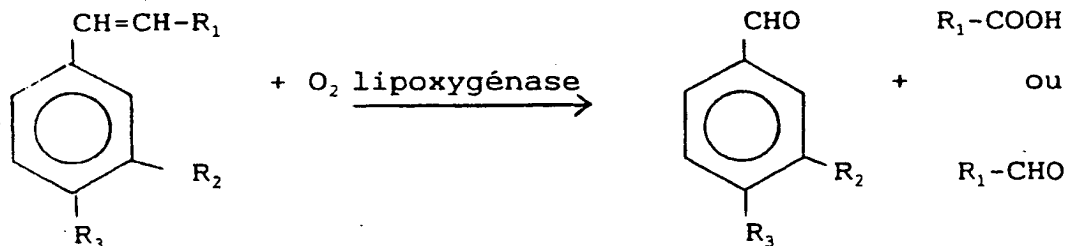
Elle est naturellement présente dans de nombreux végétaux tels que par exemple le soja, le blé ou la betterave, dans certains organes d'animaux tels que par exemple les foies de porc, de veau ou de poisson. Ces matières végétales ou animales peuvent donc constituer des sources industrielles de cette enzyme qui, de plus, peut également être synthétisée par certains microorganismes.

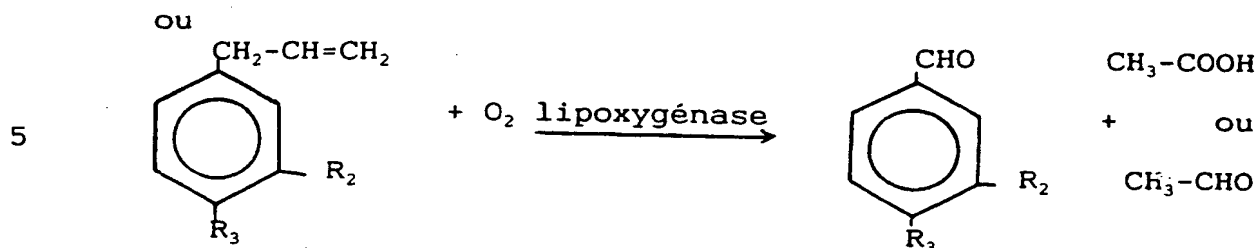
La lipoxygénase est connue notamment pour sa participation à la première étape d'un procédé permettant la synthèse d'aldéhydes à partir d'acides gras. En effet, son activité catalytique oxydative sur les acides gras insaturés, et plus particulièrement sur les acides linoléique et linolénique, donne lieu à la formation d'un hydroperoxyde pouvant ensuite être scindé en un oxoacide et un aldéhyde par une hydroperoxyde lyase.

Or, dans le cadre de l'invention, il a été trouvé que la lipoxygénase, quelle que soit son origine, pouvait à elle seule permettre la préparation de substances aromatiques de formule :



à partir de substrats représentés par les formules ci-dessus mentionnées et selon la réaction suivante :





(R_1 , R_2 et R_3 ayant les significations données précédemment).

Les substances aromatiques préférées préparées selon le procédé conforme à l'invention sont récapitulées dans le tableau I.

TABLEAU I

R_1	R_2	R_3	SUBSTRAT	ISOMERE	PRODUIT
-CH ₃	-O-CH ₃	-OH	isoeugénol	eugénol	vanilline
-CH ₂ OH	-O-CH ₃	-OH	alcool conférylique		vanilline
-CHO	-O-CH ₃	-OH	aldéhyde conférylique		vanilline
-COOH	-O-CH ₃	-OH	acide férulique		vanilline
-CH ₂ OH	-H	-H	alcool cinnamique		benzaldéhyde
-CHO	-H	-H	aldéhyde cinnamique		benzaldéhyde
-COOH	-H	-H	acide cinnamique		benzaldéhyde
-CH ₃	-H	-O-CH ₃	anéthol	estragol	aldéhyde anisique
-CH ₃	-H	-OH	anol	chavicol	aldéhyde para hydroxy benzoïque
-CH ₃	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array}$		isosafrol	safrrole	héliotropine
-COOH	-OH	-OH	acide caféique		aldéhyde proto catéchique
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_3(\text{O}-\text{CH}_3)(\text{OH}) \end{array}$	-O-CH ₃	-OH	curcumine		vanilline

FEUILLE DE REMPLACEMENT

L'eugénol, le chavicol, l'estragol et le safrole qui sont respectivement les isomères de l'isoeugénol, de l'anol, de l'anéthole et de l'isosafrole peuvent eux-mêmes être transformés par la lipoxygénase en l'aldéhyde correspondant, soit la vanilline, l'aldéhyde hydroxybenzoïque, l'aldéhyde anisique et l'héliotropine mais avec un rendement plus faible.

En effet la condition la plus importante pour que la lipoxygénase puisse exercer son action est que le substrat comporte une liaison insaturée correctement positionnée : c'est le cas notamment de toutes les molécules représentées par les formules répondant au "substrat" dont la liaison insaturée située sur la chaîne portant R_1 ou CH_2 est positionnée soit en alpha, soit en bêta du cycle aromatique. C'est aussi le cas des exemples connus que sont les acides linoléique et linolénique qui voient soit leur carbone 9, soit leur carbone 13 (constituant un système cis-cis diénique non conjugué) être le siège d'une peroxydation.

Le procédé conforme à l'invention consiste donc à mettre en présence, en milieu tamponné, agité et thermorégulé, une lipoxygénase et un substrat répondant à l'une des formules ci-dessus représentées pendant un temps suffisant pour permettre la préparation de la substance aromatique correspondante, celle-ci pouvant être ensuite récupérée par des techniques classiques d'extraction par solvant ou par distillation.

Dans le procédé conforme à l'invention, la lipoxygénase peut être utilisée sous forme purifiée ou non purifiée

Avantageusement :

- lorsqu'elle est purifiée, c'est-à-dire généralement quand elle présente une activité supérieure à 30000 u/mg, (1 unité correspondant à une augmentation de l'absorbance à 234 nm d'une valeur de 0,001 par minute lorsque l'acide linoléique est le substrat, à pH 9 et à 25°C), la lipoxygénase est utilisée à raison de 1 à 500 mg

par gramme de substrat, de préférence de 5 à 100 mg par gramme de substrat et plus préférentiellement encore de 10 à 50 mg par gramme de substrat, (à titre d'exemple, on peut utiliser une lipoxygénase commercialisée par SIGMA sous
5 forme d'une préparation enzymatique contenant au moins 60 % de protéines), et

- lorsqu'elle n'est pas purifiée, c'est-à-dire lorsqu'elle contient moins de 7500 u/mg, comme c'est le cas dans les poudres acétoniques du commerce (forme
10 préconcentrée à partir d'une matière première), ou dans un végétal frais broyé ou dans une poudre de farine végétale, ou encore, dans un organe animal frais broyé tel que le foie, elle sera utilisée à raison de 0,01 à 50 g par gramme de substrat, de préférence de 0,025 à 10 g par gramme de
15 substrat et plus préférentiellement encore, de 0,1 à 5 g par gramme de substrat.

Selon le procédé conforme à l'invention, les lipoxygénases préférentiellement utilisées sont la lipoxygénase de germes de soja et la lipoxygénase de germes de
20 blé.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé conforme à l'invention, on établit la concentration en substrat de la lipoxygénase entre 2,5 et 100 g par litre de milieu de réaction et de préférence entre 20 et 75 g par
25 litre de milieu de réaction.

Conformément à l'invention, ce milieu de réaction est un milieu aqueux tamponné. Les tampons utilisés sont des tampons classiques tels que le tampon phosphate de potassium et/ou le tampon phosphate de sodium et/ou le tampon borate
30 de sodium et/ou le tampon phosphate-citrate-borate de sodium.

Avantageusement, les molarités de ces tampons sont comprises entre 0,05 M et 0,5 M et leur pH est compris entre 2 et 10 et de préférence entre 5 et 10. Les ajustements de
35 pH se font soit avec de la potasse, soit avec de la soude, soit avec de l'acide phosphorique.

Selon d'autres caractéristiques avantageuses de l'invention :

- la température du milieu de réaction varie entre 4 et 40°C et de préférence entre 22 et 32°C ;
- 5 - la durée de la réaction varie entre 30 minutes et 7 jours, de préférence entre 2 heures et 5 jours et est déterminée par suivi cinétique des réactions ;
- l'agitation doit être suffisamment forte, pour homogénéiser ou émulsionner l'ensemble du milieu
- 10 réactionnel et pour oxygéner tout le substrat présent, et est réalisée à une vitesse comprise entre 150 et 250 tr/min.

En outre, un agent émulsifiant tel que le TWEEN 80 peut être introduit dans le milieu à raison de 0,05 à 2% en

15 volume par rapport au milieu de réaction.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé conforme à l'invention, en fonction du substrat utilisé, et en particulier quand le substrat est un composé de nature

20 phénolique, du fait de la toxicité des phénols vis-à-vis de l'enzyme, il peut être nécessaire d'ajouter dans le milieu de réaction au moins un adsorbant ou un complexant choisi dans le groupe comprenant le charbon actif à une

25 concentration comprise entre 5 et 50 g par litre, celui connu sous la marque "Amberlite" de type XAD₂ à une concentration comprise entre 5 et 50 g par litre, la bêta cyclodextrine à une concentration comprise entre 3 et 18 g par litre et le polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) à une

concentration comprise entre 10 et 60 g par litre, de façon à protéger ladite enzyme.

30 L'invention ne se limite pas strictement au procédé décrit, elle en embrasse au contraire toutes les variantes. La Société demanderesse a par exemple expérimenté de façon concluante la transformation du bêta-carotène en bêta-ionone

35 par l'action de la lipoxygénase qui agit dans ce cas au niveau d'une liaison insaturée située en position gamma par rapport au cycle de la molécule, conjuguée avec une liaison

insaturée située en position alpha par rapport au même cycle.

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention ; ils ne sont pas limitatifs et concernent les modes de réalisation avantageux de l'invention.

EXEMPLE 1

Dans un flacon contenant 20 ml de tampon borate de sodium présentant une molarité de 0,1 M et un pH de 6,5, on ajoute 0,75 g d'isoeugénol, 20 mg de lipoxygénase issue de germes de soja et titrant 36000 u/mg et 0,05 g de TWEEN 80.

Après trois jours d'incubation à 28°C et sous agitation à une vitesse de 150 tr/min, l'ensemble de l'échantillon est extrait par du dichloroéthane et la vanilline est ensuite dosée par HPLC.

La production de vanilline est de 2,85 g/l.

EXEMPLE 2

Dans les mêmes conditions que dans l'exemple 1, on ajoute au milieu de réaction 0,75 g d'eugénol à la place de l'isoeugénol en présence de 0,5 g de charbon actif.

Le rendement en vanilline est de 28,5 mg/litre.

EXEMPLE 3

Huit flacons contenant les mêmes ingrédients que dans l'exemple 1 sont incubés à 28°C sur une table agitée à 150 tr/min. Chaque jour un échantillon est extrait par le dichloroéthane et dosé par HPLC.

La cinétique est reproduite sur la figure 1.

La production de vanilline atteint 2,82 g/l.

EXEMPLE 4

Dans les mêmes conditions que dans les exemples précédents, on fait varier les concentrations en isoeugénol de 5 à 100 g/l de milieu de réaction.

On obtient une production de vanilline, représentée sur la figure 2, atteignant 2,2 g/l.

EXEMPLE 5

Dans les conditions décrites dans l'exemple 1, on

fait varier la concentration de la lipoxygénase ajoutée au milieu de réaction de 0 à 2,5 g/l de milieu de réaction.

Les quantités de vanilline produites correspondantes sont représentées sur la figure 3.

5 La production de vanilline atteint 2,9 g/l.

EXEMPLE 6

Dans les mêmes conditions que dans l'exemple 1, on ajoute 10 g/l de curcumine, préalablement traitée par de la potasse pour la solubiliser dans le milieu tampon.

10 La vanilline est obtenue avec un rendement de 37 mg/l.

EXEMPLE 7

Dans les mêmes conditions que dans l'exemple 1, on remplace l'isoeugénol par 2 g/l d'alcool coniférylique.

15 En deux jours, la vanilline est obtenue avec un rendement de 240 mg/l.

EXEMPLE 8

Dans les mêmes conditions que dans l'exemple 1, on ajoute 25 g/l d'aldéhyde cinnamique.

20 Après quatre jours d'incubation, on détecte 1,1 g/l de benzaldéhyde dans le milieu.

EXEMPLE 9

Dans les mêmes conditions que dans l'exemple 1, on ajoute 8 g/l d'anéthole.

25 Après quatre jours, on mesure 448 mg/l d'aldéhyde anisique.

EXEMPLE 10

30 Dans un flacon contenant 25 g d'aubergine broyée et 25 g de tampon borate de sodium présentant une molarité de 0,1 M et un pH de 6,5, on ajoute 0,4 g d'isoeugénol et 0,05 g de TWEEN 80. Après 3 jours d'incubation à 28°C et sous agitation à une vitesse de 200 tr/min, on détecte 1,75 g/l de vanilline.

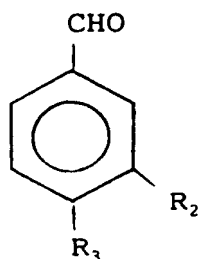
EXEMPLE 11

35 Dans un flacon contenant 20 g de tampon borate de sodium présentant une molarité de 0,1 M et un pH de 6,5 et

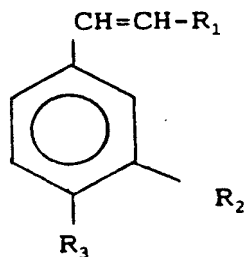
0,75 g d'isoeugénol, on ajoute 5 g de foie de porc frais broyé et 0,05 g de TWEEN 80. Après 2 jours d'incubation à 28°C et sous agitation à une vitesse de 200 tr/min, la quantité de vanilline mesurée est de 0,7 g/l.

REVENDICATIONS

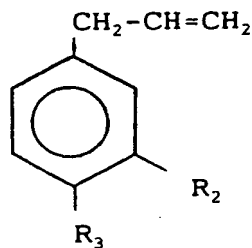
1. Procédé de préparation de substances aromatiques de formule



10 caractérisé par le fait que l'on soumet un substrat répondant à la formule :

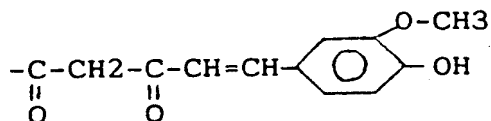


20 ou l'un des isomères de ces précurseurs, appelé également substrat, choisi notamment parmi ceux répondant à la formule :




30 dans lesquelles

R_1 peut être un radical $-CH_3$, $-CH_2OH$, $-CHO$, $-COOH$,



R_2 peut être un radical $-H$, $-OH$, $-O-CH_3$,

R_3 peut être un radical $-H$, $-OH$, $-O-CH_3$,

R₂ et R₃ peuvent former un pont méthylènedioxy 

à l'action d'une lipoxygénase.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les substances aromatiques appartiennent au groupe comprenant: la vanilline, le benzaldéhyde, l'aldéhyde anisique, l'aldéhyde parahydroxybenzoïque, l'héliotropine et l'aldéhyde protocatéchique.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que la lipoxygénase sous forme purifiée est utilisée à raison de 1 à 500 mg par gramme de substrat, de préférence entre 5 et 100 mg par gramme de substrat et plus préférentiellement encore de 10 à 50 mg par gramme de substrat.

4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que la lipoxygénase sous forme non purifiée est utilisée à raison de 0,01 à 50 g par gramme de substrat, de préférence entre 0,025 et 10 g par gramme de substrat et plus préférentiellement encore, entre 0,1 et 5 g par gramme de substrat.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que l'on utilise une lipoxygénase ou une source de lipoxygénase d'origine végétale.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que l'on utilise une lipoxygénase ou une source de lipoxygénase d'origine animale.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait qu'on établit la concentration du substrat de la lipoxygénase entre 2,5 et 100 g par litre de milieu de réaction et de préférence entre 20 et 75 g par litre de milieu de réaction.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait qu'il est mis en oeuvre dans un milieu tamponné présentant un pH compris entre 2 et 10 et de préférence entre 5 et 10.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8,

caractérisé par le fait que la température du milieu de réaction est comprise entre 4 et 40°C et de préférence entre 22 et 32°C.

5 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait que la durée de la réaction varie de 30 minutes à 7 jours et de préférence de 2 heures à 5 jours.

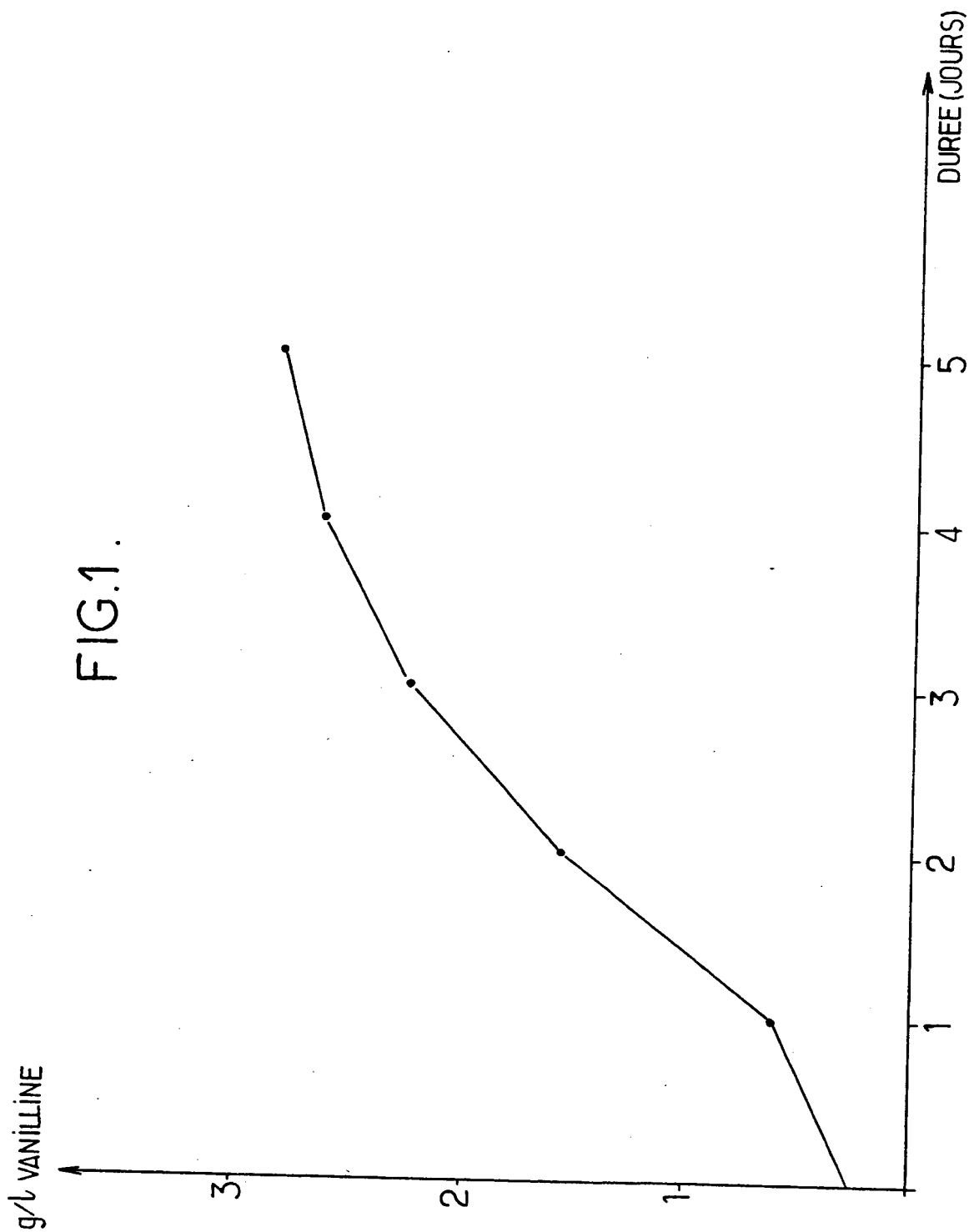
11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre sous agitation à une vitesse comprise entre 150 et 250 tr/min.

10 12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé par le fait qu'un agent émulsifiant est ajouté à raison de 0,05 à 2% en volume par rapport au milieu de réaction.

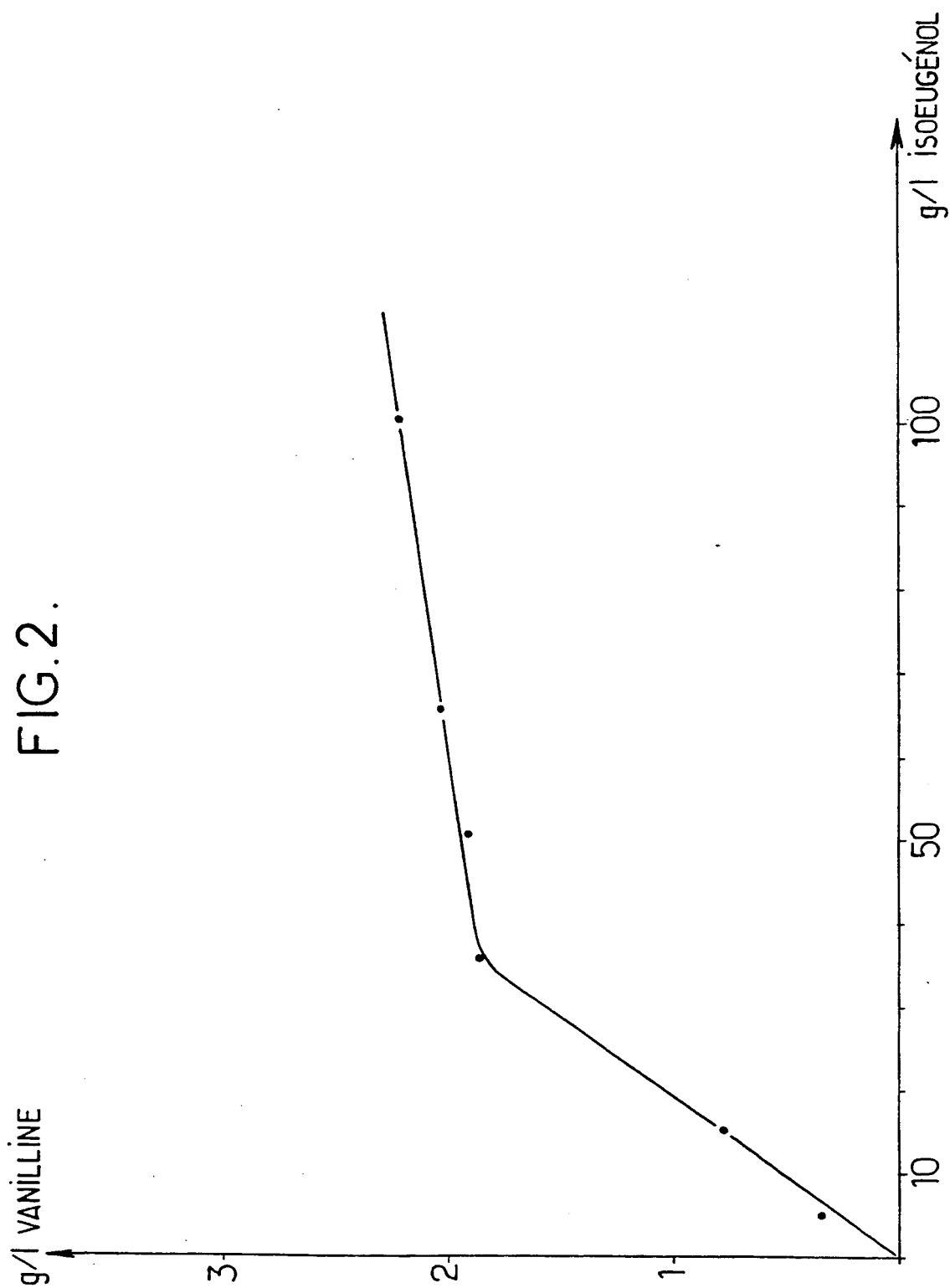
15 13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé par le fait que l'on peut ajouter dans le milieu de réaction, dans le cas où un composé de nature phénolique est utilisé comme substrat, au moins un adsorbant ou un complexant.

20 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé par le fait que l'adsorbant ou le complexant est choisi dans le groupe comprenant le charbon actif à une concentration comprise entre 5 et 50 g par litre, celui connu sous la marque "Amberlite" de type XAD₂ à une concentration comprise entre 5 et 50 g par litre, la bêta cyclodextrine à
25 une concentration comprise entre 3 et 18 g par litre et le polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) à une concentration comprise entre 10 et 60 g par litre.

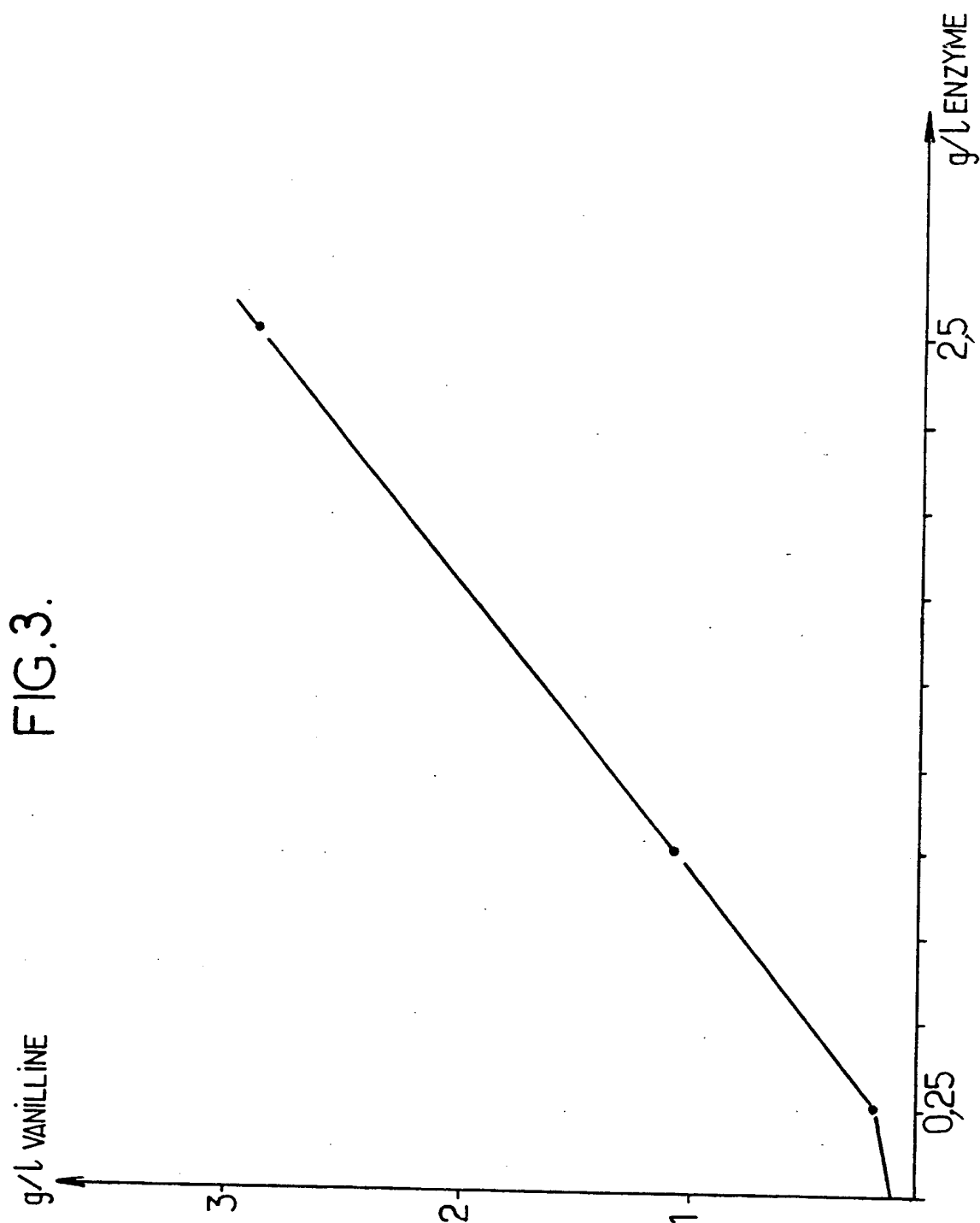
1/3



2/3



3/3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00745

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C12P 7/24; C12P 17/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, A, 0 233 570 (BASF) 26 August 1987 see claims --	1
A	EP, A, 0 453 368 (PERNOD RICARD) 23 October 1991 see claims --	1
A	US, A, 5 128 253 (IVICA M. LABUDA) 7 July 1992 see claims --	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, No. 25, 22 June 1987 Columbus, Ohio, US; abstract No. 212647y, MTEBE, KASWIJA ET AL. 'Volatiles derived from lipxygenase-catalyzed reactions in winged beans (Psophocarpus tetragonolobus)' page 547; see abstract & FOOD CHEM. vol. 23, No. 3, 1987, pages 175-182 -- ./.	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 1993 (25.10.93)

Date of mailing of the international search report

5 November 1993 (05.11.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00745

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 114, No. 3, 21 January 1991 Columbus, Ohio, US; abstract No. 22487p; YOSHIMOTO, TOMOTAKA ET AL. 'Manufacture of benzaldehydes from styrenes with dioxygenase from Pseudomonas species.' page 575; see abstract & JP, A, 2 200 192 (HASEGAWA) 8 August 1990	1
A	----- JOURNAL OF FOOD SCIENCE vol. 50, No. 1, February 1985 CHICAGO US pages 5-9 DAVID B. JOSEPHSON ET AL. 'Volatile compounds characterizing the aroma of fresh atlantic and pacific Oysters' see the whole document	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300745
SA 76848

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 25/10/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0233570	26-08-87	DE-A- 3604874	20-08-87
		JP-A- 62190092	20-08-87
		US-A- 4874701	17-10-89
		US-A- 4981795	01-01-91
EP-A-0453368	23-10-91	FR-A- 2661189	25-10-91
US-A-5128253	07-07-92	None	

EPO FORM P049

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00745

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12P7/24; C12P17/04

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification

Symboles de classification

CIB 5

C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	EP,A,0 233 570 (BASF) 26 Août 1987 voir revendications	1
A	EP,A,0 453 368 (PERNOD RICARD) 23 Octobre 1991 voir revendications	1
A	US,A,5 128 253 (IVICA M. LABUDA) 7 Juillet 1992 voir revendications	1
	-/-	

^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 OCTOBRE 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05 -11- 1993

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

DELANGHE L.L.M.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 25, 22 Juin 1987, Columbus, Ohio, US; abstract no. 212647y, MTEBE, KASWIJA ET AL. 'Volatiles derived from lipoxygenase-catalyzed reactions in winged beans (Psophocarpus tetragonolobus).' page 547 ; voir abrégé & FOOD CHEM. vol. 23, no. 3, 1987, pages 175 - 182 ---	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 114, no. 3, 21 Janvier 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 22487p, YOSHIMOTO, TOMOTAKA ET AL. 'Manufacture of benzaldehydes from styrenes with dioxygenase from Pseudomonas species.' page 575 ; voir abrégé & JP,A,2 200 192 (HASEGAWA) 8 Août 1990 ----	1
A	JOURNAL OF FOOD SCIENCE vol. 50, no. 1, Février 1985, CHICAGO US pages 5 - 9 DAVID B. JOSEPHSON ET AL. 'Volatile compounds characterizing the aroma of fresh atlantic and pacific Oysters.' voir le document en entier -----	1

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300745
SA 76848

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

25/10/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0233570	26-08-87	DE-A- 3604874	20-08-87
		JP-A- 62190092	20-08-87
		US-A- 4874701	17-10-89
		US-A- 4981795	01-01-91
EP-A-0453368	23-10-91	FR-A- 2661189	25-10-91
US-A-5128253	07-07-92	Aucun	

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

